

インスリンによるカルニチン取り込みの亢進が

持久性運動能力に及ぼす影響について

仙石 将太 (教育学部スポーツ科学課程健康体力学コース 4年)

指導教員

増田 和実 (人間社会研究域人間科学系 教授)

I. 緒言

骨格筋細胞の脂肪酸代謝過程において、カルニチンは長鎖脂肪酸をミトコンドリアマトリックス内へ輸送するという重要な役割を担う (Bremer, 1962; Walter, 1996)。そのため、カルニチンの摂取によって運動時の脂肪酸酸化が亢進したという報告もある (Fritz, 1963; Gorostiaga et al., 1989)。しかしながら、単にカルニチンを摂取しただけでは、骨格筋カルニチン量が増加するかどうかは明らかでない (Brass, 2004)。この問題には、カルニチンの筋細胞内への取り込み機序が関わると考えられる。

カルニチンの体内動態は Na^+ 依存性トランスポーター (OCTN2) によって調節される。OCTN2 は細胞内外における Na^+ の濃度勾配を駆動力としてカルニチンを能動的に細胞内へ輸送しているため、細胞外を高い $[\text{Na}^+]$ 状態に維持すれば、カルニチンの細胞内輸送が亢進するかもしれない。インスリンは筋細胞膜において Na^+/K^+ ポンプを活性させるため (Clausen, 2003)、インスリンを介して Na^+ 依存性カルニチン取り込みが亢進することが予想される。実際に健常者に対して 5 時間の高血中カルニチン濃度 ($550 \mu\text{mol/l}$) と高血中インスリン濃度 (150 mU/l) の維持が、骨格筋カルニチン量を 15% 増加させた (Stephens et al. 2006)。したがって、インスリンとカルニチンの併用投与によって骨格筋カルニチン量を増加させることができれば、その効果が持久性運動能力の向上として反映される可能性がある。

本研究の目的は、カルニチンとインスリンの併用投与によって骨格筋内へのカルニチン取り込みを亢進させ、それが運動パフォーマンスに及ぼす影響を調査することである。

II. 実験方法

1. 被験動物およびグループ分け

被験動物には 12 週齢の Wistar 系雄性ラット (三共ラボサービス, 日本) を用いた。ラットは無作為に对照 (CON) 群、インスリン投与 (INS) 群、カルニチン投与 (CA) 群、カルニチン+インスリン投与 (CA+INS) 群に分類した (各群 $n=6$)。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗明周期 12 時間の飼育ケージにて、1 週間の予備飼育を行い、その間の飼料 (オリエンタル酵母, 日本) および飲水はともに自由摂食とした。

2. 投与試薬および投与方法

投与試薬には、カルニチン（カルニピュア 100%, Lonza, Japan）、インスリン（ヒューマリン R 注 U-100/ml, 日本イーライリリー, Japan）を用いた。

CA 群、CA+INS 群にはカルニチンを 28 mg/kg 経口投与した。また、INS 群、CON 群においては蒸留水を経口投与した。なお、経口投与後は絶食とした。

INS 群、CA+INS 群にはインスリンを 0.025 U/kg 麻酔下において静脈投与した。また、1 回の投与量 5 ml/kg を 5 分毎に 20 回投与した。

3. 実験手順

実験の前日に、全ての群において尾静脈から採血を行った。実験の当日は、CON 群、INS 群に蒸留水、CA 群、CA+INS 群にカルニチン溶液をそれぞれ 1 ml 経口投与した。以降の実験は、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg; ネンブタール注射液, 大日本製薬, 日本) による麻酔下で行った。INS 群、CA+INS 群においては経口投与から 5 時間 30 分後に頸静脈よりインスリン溶液を投与した。経口投与から 7 時間 10 分後 (INS 群、CA+INS 群においてはインスリン投与終了 5 分後) に頸静脈から採血した。さらに、右大腿動脈を結紮した直後、右下腿三頭筋 (pre-contraction) を摘出した。その後、左脚を運動脚として等尺性足底屈運動を 5 分間行った。運動終了直後に、速やかに心臓を停止させ、採血および左下腿三頭筋の摘出を行った。実験プロトコルを Figure 1 に示した。

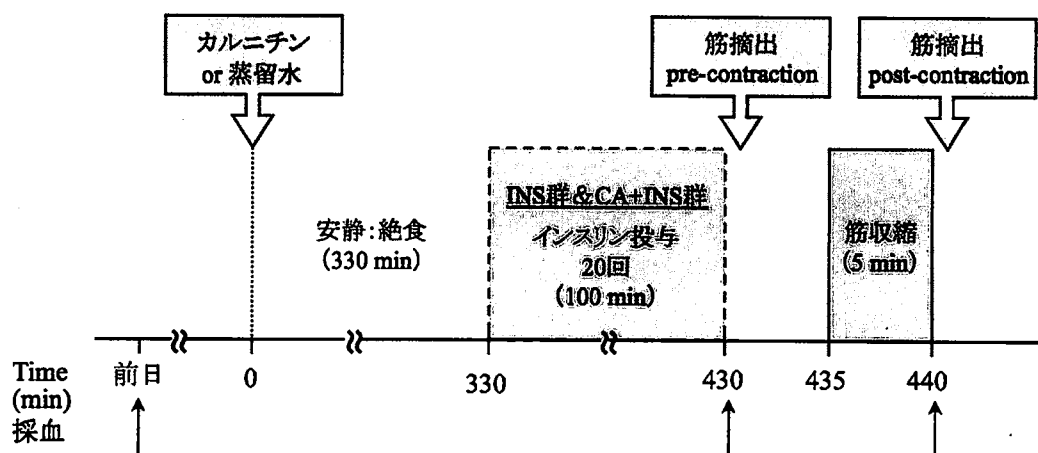


Figure 1. 運動プロトコル.

4. 測定項目

A. 血中および骨格筋カルニチン量

採取した血液を遠心分離装置 (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany) によって遠心分離し (1500 g, 10 min, 4°C)、得られた血清を-80°C下で凍結保存した。

測定筋には腓腹筋、足底屈筋を用い、遊離カルニチン、アシルカルニチン量を測定した。カルニチンの測定にはカルニチン測定キット（総カルニチン カイノス, カイノス株式会社, 日本）を用いた。筋サンプル（~20 mg）に9倍量の3%の過塩素酸（HClO₄）を加えて、ポリトロンホモジナイザー（PT 1200 CL, Polytron, Switzerland）を用いてホモジネートを行った。氷上で15分間保持した後、遠心分離した（1500 g, 10 min, 4°C）。得られた上清に等量の100 mM リン酸バッファー（pH 7.4）を加えて測定サンプルとした。

B. 骨格筋内グリコーゲン量

表面電気刺激による筋収縮運動前後に腓腹筋（gas）のグリコーゲン量を測定した。測定にはグリコーゲン測定キット（Glycogen Assay Kit, BioVision, USA）を用いた。筋サンプル（~20 mg）を乳鉢に入れ、液体窒素内で破碎した後、20倍量の超純水を加えてホモジネートを行った。その後、ホモジネート溶液を5分間煮沸した後、遠心分離し（13000 g, 5 min, 4°C）、得られた上清を測定サンプルとした。

C. 筋発揮張力

左脚を運動脚として後肢コントロールユニット（Model RU-72, NEC Medical Systems, Japan）に固定した（足関節角度 90°）。腓腹筋に表面電極（Vitrode A, Nihon kohden, Japan）を取り付け、電気刺激装置（Electric Stimulator, Nihon kohden, Japan）によって筋収縮を誘発した。電気刺激は10 V、1 Hzの強縮性収縮運動に設定し、等尺性足底屈運動を5分間行った。測定中に得られた全てのデータは、AD変換器（Power Lab/8SP, AD Instruments, Australia）を介してPCに取り込んだ。また、実験中は得られたデータを画面上でモニタリングした。

4. 統計処理

全ての統計量は平均値±標準偏差で表した。群間の比較には一元配置分散分析を行い、有意差がみられた場合、Tukey-Kramerのpost-hocテストを行った。有意水準は5%未満とした。

III. 結果

Table 1は筋収縮テスト前後における腓腹筋深層部（gasD）の遊離カルニチン濃度とアシルカルニチン濃度、および筋収縮前後の差を示している。筋収縮前と後の各時点において筋内の遊離カルニチン濃度とアシルカルニチン濃度に群間の有意差は認められなかった（Table 1）。また、腓腹筋表層部（gasS）と足底筋（pla）においても筋収縮前におけるカルニチン量は群間に有意差が認められなかった（Data Not Shown）。

CON群とINS群、CA群では筋収縮に伴って筋内の遊離カルニチン濃度は減少し、アシルカルニチン濃度は増加した。しかしながら、CA+INS群は筋収縮に伴って遊離カルニチンの減少は確認されず、筋収縮前後における遊離カルニチンの変化量はCON群と比較して有意な低値を示した（ $p < 0.05$ ）。

Table 1. Contents of free carnitine and acylcarnitine in the deep portion of m. gastrocnemius of rats before and after contraction and the differences.

	Time	CON	INS	CA	CA+INS
free carnitine (nmol/g tissue)	pre	674.7 ± 46.1	692.4 ± 61.1	632.6 ± 128.2	588.5 ± 93.4
	post	486.5 ± 72.9	586.8 ± 99.8	508.0 ± 65.0	597.4 ± 41.4
	delta	-188.2 ± 53.5	-105.6 ± 130.2	-124.7 ± 64.4	8.9 ± 15.7*
acylcarnitine (nmol/g tissue)	pre	257.1 ± 151.3	183.2 ± 39.4	216.7 ± 141.5	258.2 ± 110.9
	post	310.6 ± 42.0	313.3 ± 77.6	281.1 ± 39.1	273.9 ± 42.8
	delta	46.1 ± 118.7	88.4 ± 53.8	91.1 ± 65.0	86.6 ± 27.8

The values are means ± SD. *: p < 0.05 vs CON.

CON: control rats, INS: insulin infused rats, CA: carnitine supplemented rats, CA+INS: carnitine supplemented and insulin infused rats.

Table 2 は筋収縮テスト前後における血液中の遊離カルニチン濃度とアシルカルニチン濃度、および筋収縮前後の差を示している。CA 群の血中遊離カルニチン濃度は CON 群と INS 群に対して有意な高値を示した (Table 2, p < 0.05)。また、アシルカルニチン濃度については CA 群と CA+INS 群がそれぞれ CON 群と INS 群に対して有意な高値を示した (Table 2, p < 0.05)。CA+INS 群は筋収縮テスト後に血中のアシルカルニチン濃度が増加し、その増加量は CON 群と INS 群、CA 群に対して高値を示した (p < 0.05)。

Table 2. Concentration of free carnitine and acylcarnitine in the plasma before and after contraction and the differences.

	Time	CON	INS	CA	CA+INS
free carnitine (mmol/l)	pre	24.1 ± 7.2	21.6 ± 3.5	45.6 ± 13.6*†	38.4 ± 12.9
	post	26.3 ± 8.3	25.8 ± 6.2	48.9 ± 12.6*†	41.8 ± 15.3
	delta	2.2 ± 4.2	4.2 ± 6.0	3.3 ± 4.4	3.5 ± 6.2
acylcarnitine (mmol/l)	pre	12.3 ± 3.3	13.2 ± 1.8	24.8 ± 2.8*†	27.0 ± 6.0*†
	post	14.2 ± 4.0	14.6 ± 2.9	26.2 ± 3.7*†	35.1 ± 7.4*†§
	delta	1.9 ± 1.2	1.5 ± 2.6	1.4 ± 1.3	8.1 ± 2.6*†§

The values are means ± SD. *: p < 0.05 vs CON. †: p < 0.05 vs INS. §: p < 0.05 vs CA

CON: control rats, INS: insulin infused rats, CA: carnitine supplemented rats, CA+INS: carnitine supplemented and insulin infused rats.

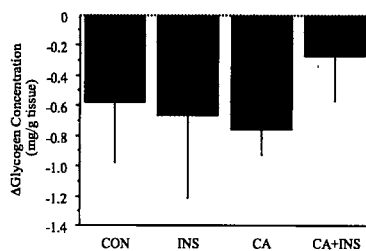


Figure 2. 筋収縮に伴う筋内グリコーゲンの減少量。

筋収縮テスト前後における筋内グリコーゲン量の差を減少量として示した。いずれの群においても有意差は認められなかったが、CA+INSにおいては他の群と比較して筋内グリコーゲン量の差が小さい傾向がみられた (p = 0.25). The values are means ± SD, F = 1.525, CON: control rats, INS: insulin infused rats, CA: carnitine supplemented rats, CA+INS: carnitine supplemented and insulin infused rats.

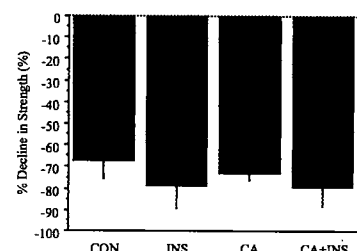


Figure 3. 発揮筋力の低下率。

表面電気刺激による5分間の等尺性筋収縮運動を行った結果、発揮筋力の低下率に有意差は認められなかった。 The values are means ± SD, F = 2.479, CON: control rats, INS: insulin infused rats, CA: carnitine supplemented rats, CA+INS: carnitine supplemented and insulin infused rats.

筋収縮に伴う骨格筋内グリコーゲンの減少量は、いずれの群においても統計的有意差は認められなかった。しかしながら、CA+INS 群においては他の群と比較して骨格筋内グリコーゲン減少量の差が小さい傾向がみられた (Figure 2)。

Figure 3 は等尺性筋収縮中の発揮張力の低下率を表している。5 分間の電気刺激によって足底屈運動の発揮張力は 67~83%低下した (Figure 3)。発揮張力の低下率に群間の有意差は認められなかった。

IV. 考察

本研究では、カルニチンとインスリンの併用投与によって骨格筋内へのカルニチン取り込みを亢進させ、それが運動パフォーマンスに及ぼす影響を調査することを目的とした。Stephens et al. (2006) はヒトを対象に高カルニチン血症と高インスリン血症を 5 時間持続させた結果、骨格筋カルニチン量が 15%増加したと報告した。しかしながら、本研究では、CA+INS 群における骨格筋カルニチン量の増加は認められなかった (Table 1)。これらの結果は、先行研究と比較して本研究のカルニチン投与濃度が低かったこと、また先行研究ではカルニチンおよびインスリンの投与方法が clamp 法を用いた継続的な方法であったことに対して、本研究では断続的な投与方法であったことが原因として考えられる。しかしながら、CON 群と INS 群、CA 群で認められた筋収縮に伴う遊離カルニチンの減少およびアシルカルニチンの増加が、CA+INS 群においては認められなかった (Table 1)。さらに、CA+INS 群は筋収縮後に血中のアシルカルニチン量が増加した (Table 2)。これらの結果は、CA+INS 群において、見かけ上の筋内のカルニチン含量は変化していないものの、筋細胞内外におけるカルニチンの輸送が亢進していることを示唆している。

カルニチンは筋収縮によって過剰に生成されたアセチル CoA のアセチル基と結合することで、アセチルカルニチンを形成する。したがって、高強度運動時は、筋内の遊離カルニチン量が減少し、アセチルカルニチン (短鎖アシルカルニチン) が増加する (Stephens et al., 2007)。しかしながら、本研究ではカルニチンとインスリンの併用投与によって筋収縮後のアシルカルニチンの増加が抑制され、血中にアシルカルニチンが増加していた (Table 2)。これは筋細胞膜におけるカルニチンの輸送が活性化され、筋収縮中、即時的に遊離カルニチンが血中から供給されていたことに起因すると推察される。

CA+INS 群においては、筋内へのカルニチンの取り込みが亢進されたが、運動パフォーマンスに対する明確な影響は認められなかった。しかしながら、筋収縮テスト前後のグリコーゲンの減少量は CA+INS 群が他の群と比較して小さい傾向がみられた (Figure 2)。これは、我々のインスリンによるカルニチン取り込みの亢進が、脂肪酸酸化を亢進させ、糖代謝を抑制するという仮説と少なからず一致している。CA+INS 群では、即時的に筋細胞内へ遊離カルニチンが供給されたことによってカルニチン availability が維持されたと推察される。その結果、カルニチンによる脂肪酸のミトコンドリア内輸送が維持されたのかもしれない。

また、我々の研究結果では 5 分間の強縮性収縮の発揮張力については、張力の低下率に

群間の有意差は認められなかった (Figure 3)。カルニチン摂取は骨格筋カルニチン量を増加させて脂質代謝を亢進させると考えられているが、ヒトにおいては数日間のカルニチン摂取においても筋内カルニチン貯蔵量に対して効果は無いとの報告もある (Brass, 2004)。そのため、我々の研究においても、カルニチンおよび、インスリンの摂取期間が短かったため、疲労困憊に至るまでの時間に差がなかったのかもしれない。

V. 結論

本研究では、インスリンとカルニチンの併用投与が骨格筋細胞へのカルニチン取り込みの亢進や筋持久力に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。得られた主な結果は以下の通りである。

- 1) 本研究の結果、カルニチンとインスリンの併用投与によって安静時における骨格筋カルニチン量は増加しなかった。
- 2) CA+INS 群は他の群に対して、筋収縮に伴う筋内アシルカルニチンの増加は低値を示し、血中のアシルカルニチン濃度は筋収縮後に増加した。
- 3) 筋収縮に伴う筋内のグリコーゲン量の減少は、カルニチンとインスリンの併用投与によって抑制される傾向にあった。
- 4) 等尺性運動中における発揮張力の低下は、カルニチンとインスリンの併用投与の影響は認められなかった。

謝辞

本研究課題をご支援下さった 金沢大学・学長 中村信一 先生に深く感謝申し上げます。また、本実験に際して多くの技術的支援を賜りました 古市泰郎 氏、高倉久志 氏 (大学院自然科学研究科)、嶋田裕哉 氏 (大学院教育学研究科)、王堂哲 氏、田辺康治 氏 (Lonza)、岩崎満 氏 (カynos) に感謝申し上げます。

References

- Brass EP (2004) Carnitine and sports medicine: use or abuse? *Ann N Y Acad Sci* 1033: 67-78.
- Bremer J (1962) Carnitine as a fatty acid carrier in intermediary metabolism. *Nature* 196: 993-994
- Clausen T (2003) $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev* 83: 1269-1324.
- Fritz IB (1963) Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Adv Lipid Res* 1: 285.
- Gorostiaga EM, Maurer CA, Eclache JP (1989) Decrease in respiratory quotient during exercise following L-carnitine supplementation. *Int J Sports Med Review* 10 (3): 169-74.
- Stephens FB, Constantin-Teodosiu D and Greenhaff PL (2007) New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* 1;581(Pt 2): 431-44.
- Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ and Greenhaff PL (2006) Insulin stimulates L-carnitine accumulation in human skeletal muscle. *FASEB J* 20: 377-379.
- Walter JH (1996) L-carnitine *Arch. Dis Child* 74: 475-478.